



TITLE:

Changes in the capacity for clonal growth  
and differentiation in vitro of the vertebral  
cartilage cells with embryonic development(  
Abstract\_要旨)

AUTHOR(S):

Watanabe, Kazuo

---

CITATION:

Watanabe, Kazuo. Changes in the capacity for clonal growth and differentiation in vitro of the vertebral cartilage cells with embryonic development. 京都大学, 1971, 理学博士

ISSUE DATE:

1971-07-23

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/213721>

RIGHT:

氏 名	渡 辺 一 雄 わた なべ かず お
学 位 の 種 類	理 学 博 士
学 位 記 番 号	理 博 第 223 号
学位授与の日付	昭 和 46 年 7 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 動 物 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	<b>Changes in the capacity for clonal growth and differentiation <i>in vitro</i> of the vertebral cartilage cells with embryonic development</b> (培養下での脊椎軟骨細胞のコロニー形成能および分化能の発生に伴う変化)
論文調査委員	(主 査) 教 授 岡 田 節 人    教 授 加 藤    勝    教 授 竹 内 郁 夫

### 論 文 内 容 の 要 旨

脊椎動物の個体発生に伴って、個々の細胞をガラス器内に分離、培養した場合、その増殖および分化能力にどのような変化を生じているかを研究したものである。研究材料としては培養実験に最も適したもの、という見地から、ニワトリ胚の脊椎軟骨をえらんで実験を行なった。

発生中のニワトリ胚の第26期(孵卵約3日)のものから、第40期(孵卵約10日)に至る間の種々の段階にあるものから、脊椎軟骨、または未分化の脊椎軟骨を切出して、トリプシン処理によって単一のばらばらの細胞けんたく液とし、約100~300個の細胞を各培養皿に入れた。F12培養液に牛胎児血清を加えたものを培地として約2週間にわたる培養を行なって、この間の増殖の過程と、分化の有無を検した。

最も若い胚である第26期の細胞は、このような条件下で、2週間に軟骨に分化しうるものは約0.1%に過ぎない。一方、最も年をとった胚である第40期の細胞では、38%が軟骨に分化した。これらの中間の時期にある胚の培養実験から、このような分化能力のある細胞の増加は、発生に伴って漸次に起こっているものではなく、第36期から第37期の間で、5%から35%までの激増のあることを知った。

軟骨細胞の分化は、単一の細胞が培養条件下でよく増殖し、細胞数が約1,000個以上のコロニーをつくったものについてのみ起こり、またコロニーをつくったものの殆んどは分化も起こっている。従って、増殖と分化は不可分の関係にあるので、次には培養下の増殖のありさまを、マークした各細胞について追跡した。その結果によると、培養後一週間では、どの時期の胚からとった細胞であっても等しく活発に増殖している。ところが第36期より若い時期の胚の細胞は、培養下で5~6回程度の分裂を行なった後は増殖することなく退行するのである。若い胚の細胞の多くが増殖、分化や遂行しえないのは、このような「退行的コロニー」を作るものが多いからに他ならない。

これらの実験結果から、第36期より若い胚の細胞の多くには、その以後の細胞の多くが保持している要因に欠けていることを示唆する。このような要因を培地中に外から加えることによって、退行すべき運命にある細胞を活性化させて、コロニーをつくらせ、分化を促すことが可能ではないか、という意図で実験

が行なわれた。このような要因は、第37期以後の細胞は、自己的に生産しうるものであろうから、このような細胞を多数に培養した、培養液（これを条件づけられた培地、とよぶ。（以下 CM と略記する）の再使用によって若い胚の細胞に持続的な増殖が可能となるのではないかと考えられた。実験の結果はよくこの予想の正しさを証明するものであって、第35期の細胞のコロニー形成率をコントロール実験の1%から25%にまで高めることができた。CM の作用は持続的な細胞分裂を可能にすることにある事実が示され、また細胞を一時的に CM で処理するだけでは効果がみられないことも判った。CM の作用は濃度に依存しており、CM になんらかの有効分子が含まれる可能性を示唆する。この有効分子は、かなり大分子であって透選によって除去されない。熱にはかなり安定であって、56°C 30分の処理によっても、その活性は失なわれない。

### 論文審査の結果の要旨

多細胞動物において細胞の分化を、最も直接的に研究する方法は、単一の細胞だけを分離してガラス器内に培養し、その増殖、分化のありさまを連続的に観察することであろう。しかし、実際には、多細胞動物の細胞で、このような実験を行なうことは、永らく不可能視されてきたのであって、細胞分化の研究は、いわばなんらかの意味で間接的な研究法に依存してきたのであった。

1960年代になって、アメリカの 2, 3 の研究室で、このような培養に成功もたされた。これは細胞分化の研究に画期的な意義をもつものであるが、技術的には困難が頗る大であって、ごく限られた研究室で、ごく限られた材料について成功をみたに過ぎない。申請者は、わが国の条件において、始めてこのような培養実験の成功を確立したのであって、その努力はまづ評価されねばならない。

ところで、今まで単一細胞の培養は、発生的にいえば、かなりおそい時期の、すでに細胞、組織の分化を完成した胚についてのみが研究が行なわれてきた。申請者は、単一細胞における培養における観察によって、個体発生に伴って起こる細胞の性状の変化を最も的確に把握できるものと考えて、発生中の各段階の胚における培養実験を行なった。その結果、第36期から第37期において細胞の自律的な増殖、分化能に著しい変化の起こることを指摘した。このような性質の変化は従来の発生についての研究では全く未知のものである。

若い胚の細胞は、自律的に増殖を持続しえず退行する傾向がある。このような細胞に持続的な増殖と分化を可能にするために、申請者は、「条件づけられた培地」の使用を試み、よく成功をみている。申請者は、このような「条件づけられた培地」を単に技術として駆使するだけでなく、この培地中の有効成分を分析することから、逆に若い胚の細胞に欠けている因子を探ろうとする企画を示し、いくらかの成功をみている。

以上に要約されるように、申請者の業績は細胞分化の研究の、最も基本的な面に貢献するものである。

よって、本論文は、理学博士の学位論文として価値あるものと認める。